

CRIOPRESERVAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS IMATUROS COM 1,2 PROPANEDIOL¹

LUIZ SÉRGIO DE ALMEIDA CAMARGO², WANDERLEI FERREIRA DE SÁ, ADEMIR DE MORAES FERREIRA³, FLAMARION TENÓRIO ALBUQUERQUE⁴ EDUARDO PAULINO DA COSTA⁵ e JOÃO HENRIQUE MOREIRA VIANA⁶

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de dois gradientes de concentrações de 1,2 propanediol (PROH) na criopreservação de ovócitos imaturos, envoltos em células do *cumulus*, de bovinos abatidos em matadouro. No tratamento 1, com uso de 1,6 M de PROH, os ovócitos foram desidratados em três etapas crescentes (0,53; 1,06 e 1,6 M), à temperatura ambiente e congelados em nitrogênio líquido. A descongelação foi realizada em água a 37°C por 30 segundos e a reidratação em três etapas decrescentes (1,6; 1,06 e 0,53 M), acrescidos de 0,25 M de sacarose cada. No tratamento 2 foi utilizado 2,0 M de PROH, de maneira semelhante ao tratamento 1, com desidratação contendo 0,7; 1,4 e 2,0 M, e reidratação 2,0; 1,4 e 0,7 M. Após a reidratação, os ovócitos foram lavados em meio TCM 199 (Meio de Cultivo para Tecidos) e levados para maturação *in vitro*. O grupo controle foi constituído de ovócitos recém-colhidos. Os ovócitos foram colocados para maturar por 24 horas, em meio TCM 199 com 10% de SVC (Soro de Vaca em Cio) e FSH (Hormônio Estimulante de Folículo), em co-cultura com células da granulosa, com 5% CO₂ no ar a 39°C. Os resultados de maturação nuclear foram diferentes (P<0,05) entre os ovócitos criopreservados e controle, sendo 2,04%, 0% e 84% para o tratamento 1, 2 e controle, respectivamente.

Termos para indexação: maturação *in vitro*.

CRYOPRESERVATION OF IMMATURE BOVINE OOCYTES WITH 1,2 PROPANEDIOL

ABSTRACT - A study was carried out to investigate the ability of immature bovine *cumulus*-oocytes complexes to survive cryopreservation and undergo subsequent *in vitro* maturation in two different levels of propanediol (PROH). Treatment 1 consisted of subjecting oocytes to a gradual 3-step, concentration-driven dehydration with PROH (0.53; 1.06 and 1.6 M) at room temperature and subsequent freezing. Oocytes were thawed in water at 37°C for 30 seconds and subjected to a gradual 3-step, concentration-driven rehydration with PROH (1.6; 1.06 and 0.53 M) in the presence of 0.25 M sucrose. Treatment 2 was conducted the same way, but PROH concentrations for dehydration were 0.7; 1.4 and 2.0 M and for rehydration were 2.0; 1.4 and 0.7 M. After rehydration, oocytes of both treatments were washed in TCM 199 medium followed by the *in vitro* maturation. The control consisted of nonfrozen oocytes. Oocytes of all groups were cultured in TCM 199 medium with 10% ECS and FSH, and 5% CO₂ air in co-culture at 39°C, for 24 hours. The *in vitro* maturation rate of cryopreserved oocytes were different for treatments and control. Metafase II was reached by 2.04%, 0% and 84% for treatment 1, 2 and control, respectively.

Index terms: *in vitro* maturation.

¹ Aceito para publicação em 31 de julho de 1997.

² Méd. Vet., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (CNPGL), Rod. MG 133, km 42, CEP 36155-000 Coronel Pacheco, MG. Bolsista da CAPES .

³ Méd. Vet., Dr., Embrapa-CNPGL.

⁴ Méd. Vet., Ph.D., Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Antiga Rodovia Rio-São Paulo, Km 47, CEP 23851-970 Seropédica, RJ.

⁵ Méd. Vet., Dr., Dep. de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Av. P.H. Rolfs, s/nº, Campus Universitário, CEP 36970-000 Viçosa, MG.

⁶ Méd. Vet., M.Sc., Embrapa-CNPGL. Bolsista do CNPq.

INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento de novas biotécnicas, como a fecundação *in vitro* e a clonagem, tem surgido grande interesse na criopreservação de ovócitos de mamíferos. No entanto, a capacidade de desenvolvimento desses gametas criopreservados é extremamente limitada (Parks & Ruffing, 1992). Em geral, ovócitos bovinos criopreservados apresentam uma baixa capacidade de desenvolvimento quando comparados com

embriões em estádios mais tardios, o que leva a concluir que esses gametas não têm sido congelados com sucesso para a subsequente fecundação *in vitro* e produção de descendentes normais (Niemann, 1991).

Estudos com ovócitos de camundongos têm demonstrado os efeitos da criopreservação sobre os fusos meióticos (Parks & Ruffing, 1992) na ativação partenogenética (Shaw & Trouson, 1989) e na indução à aneuploidia e poliploidia (Kola et al., 1988; Carroll et al., 1989).

Certas condições de resfriamento e exposição de ovócitos maturados aos crioprotetores podem induzir a uma instabilidade dos fusos meióticos. Isso provoca uma segregação anormal dos cromossomos quando a meiose é reiniciada, na fecundação, produzindo anormalidades cromossômicas (Pickering & Johnson, 1987). Por essa razão pode ser aconselhável congelar ovócitos imaturos, em estágio de vesícula germinal (VG). Segundo Van Blerkom (1989), as alterações resultantes da criopreservação sobre os fusos meióticos de ovócitos maturados não são significantes durante a congelação de ovócitos imaturos, mas podem interferir na fecundação.

As taxas de maturação *in vitro* de ovócitos imaturos criopreservados têm permanecido baixas. Yang et al. (1994) observaram 8,3% quando utilizaram ovócitos envoltos com células do *cumulus*, congelados em 1,6 M de 1,2 propanediol (PROH) mais 0,1 M de sucrose enquanto Lim et al. (1992) obtiveram 34,8% ao utilizarem 1,0 M de glicerol para congelar ovócitos envoltos com células do *cumulus*. Esses estudos demonstram uma grande variação da resposta dos ovócitos bovinos imaturos frente à criopreservação.

Como crioprotetor, o PROH tem apresentado melhores resultados (Otoi et al., 1993), porém alguns trabalhos não revelaram diferença entre crioprotetores (Schellander et al., 1994).

Este trabalho teve por objetivo estudar a eficiência de duas concentrações de 1,2 propanediol na criopreservação de ovócitos bovinos imaturos, com a observação da viabilidade após descongelação e subsequente maturação *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ovócitos foram aspirados de ovários de fêmeas bovinas mestiças, colhidos em matadouro distante 35 km do laboratório. Os ovários foram transportados em frascos com solução fisiológica (0,9% NaCl) contendo antibióticos (0,1 g/L de sulfato de estreptomicina), à temperatura entre 30 e 34°C, por período de três horas após a coleta. O experimento foi conduzido de janeiro a julho de 1995, no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG.

Foram puncionados folículos de diâmetro superior a 1,5 mm e o conteúdo foi depositado em um cálice cônico contendo meio Talp Hepes (Bavister et al., 1983), previamente aquecido a 37°C. Após período de decantação de 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com meio Talp Hepes e depositado em uma placa-de-Petri, mantida em placa aquecedora a 38°C, onde ocorreu a manipulação dos ovócitos. Os ovócitos foram lavados duas vezes em meio Talp Hepes e, em seguida, avaliados morfológicamente. Os ovócitos contendo células do *cumulus ooflorus* compacto, com, no mínimo três camadas (complexo ovócito-*cumulus*, COC), e citoplasma homogêneo foram classificados como viáveis e selecionados.

Neste experimento os ovócitos viáveis foram divididos aleatoriamente entre dois tratamentos e um grupo controle. Todos os ovócitos foram congelados com suas respectivas células do *cumulus* (complexo ovócito-*cumulus*, COC).

O meio utilizado para congelar e descongelar foi o TCM 199, acrescido de 0,4% de albumina sérica bovina. Os tratamentos utilizados para este experimento foram os seguintes:

Tratamento 1

Foram avaliados 98 COC, congelados em 1,6 M de PROH pelo método clássico. Logo após a lavagem em Talp Hepes, os COC foram desidratados em três banhos (etapas), com concentrações crescentes do crioprotetor, de dez minutos cada, à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), conforme segue: 1ª etapa: 0,53 M de PROH; 2ª etapa: 1,06 M de PROH; 3ª etapa: 1,6 M de PROH.

Antes de completar a 3ª etapa, os COC foram envasados em palhetas de 0,25 mL. Ao término dessa etapa foram levados à máquina de congelação (BIO-COOL™, FTS Systems Inc., modelo BC-70-4A), previamente resfriada a -7°C, onde permaneceram por 10 minutos para estabilização, realizando-se logo em seguida o "seeding", seguido de mais cinco minutos para nova estabilização. Após esse período, a temperatura baixa de -7 para -32°C à velocidade de 0,5°C/minuto. Ao atingir -32°C, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196°C), e armazenadas nesse meio por, no mínimo, uma semana.

A descongelação foi feita em água a 37°C, por 30 segundos, e a reidratação à temperatura ambiente, em três banhos (etapas) com concentrações decrescentes do crioprotetor, adicionados de 0,25 M de sacarose, com sete minutos de

duração para cada etapa, conforme segue: 1ª etapa: 1,6 M de PROH + 0,25 M de sacarose; 2ª etapa: 1,06 M de PROH + 0,25 M de sacarose; 3ª etapa: 0,53 M de PROH + 0,25 M de sacarose.

Tratamento 2

Foram avaliados 135 COC congelados em 2,0 M de PROH, pelo método clássico. A desidratação foi realizada da mesma maneira que o tratamento 1, contendo apenas concentrações diferentes do crioprotetor, que foram as seguintes: 1ª etapa: 0,7 M de PROH; 2ª etapa: 1,4 M de PROH; 3ª etapa: 2,0 M de PROH.

A curva de congelamento foi a mesma do tratamento 1, assim como a descongelamento e reidratação, com as seguintes concentrações do crioprotetor: 1ª etapa: 2,0 M de PROH + 0,25 M de sacarose; 2ª etapa: 1,4 M de PROH + 0,25 M de sacarose; 3ª etapa: 0,7 M de PROH + 0,25 M de sacarose.

Logo após a reidratação, os COC de ambos os tratamentos foram lavados duas vezes em meio TCM 199 (Costa, 1994). Após as lavagens, os COC foram colocados para maturar *in vitro*.

Controle

Constituiu-se de 131 COC não congelados (frescos), levados para maturação *in vitro* logo após a seleção.

Os cultivos *in vitro* nos três tratamentos foram realizados em placas-de-Petri de 35 milímetros de diâmetro, contendo 3 mL de TCM 199, conforme Costa (1994). Os cultivos foram realizados em estufa incubadora (NAPCO, modelo 6100) a 39°C, sob atmosfera com 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade, por 24 horas.

Após a maturação, os ovócitos foram desnudados, hipotonizados, fixados em lâminas e corados comorceína a 2% (Costa, 1994), para avaliação da taxa de maturação nuclear.

Foram realizadas três repetições para cada tratamento. Os dados obtidos foram analisados pelo teste do Qui Quadrado (Pimentel-Gomes, 1977).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número e a porcentagem de ovócitos que atingiram metáfase I e metáfase II em ambos os tratamentos estão na Tabela 1. A Fig. 1 mostra configuração cromossômica em metáfase II de ovócitos criopreservados com 1,6 M de PROH. Observa-se um efeito adverso da criopreservação sobre os ovócitos dos grupos tratados, evitando que atinjam as fases de metáfase I e II. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre a congelamento com 1,6 e 2,0 M de PROH. Todavia, ambos os tratamentos foram significativamente ($P < 0,05$) inferiores ao controle com relação ao número de ovócitos que atingiram a metáfase II.

A taxa de maturação *in vitro* do grupo controle (84%), encontrada neste experimento, foi superior aos 78% encontrados por Ocaña Quero et al. (1994); aos 80% citados por Greve & Madison (1991); e inferiores aos 93,1% encontrados por Costa (1994).

TABELA 1. Efeito da criopreservação com 1,2 propanediol (PROH) sobre a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos¹.

Tratamento	Nº	Metáfase I nº (%)	Metáfase II nº (%)
0,53 - 1,6 M PROH	98	3 (3,06)	2 (2,04)b
0,70 - 2,0 M PROH	135	2 (1,48)	0 (0) b
Controle	131	11 (8,39)	110 (84)a

¹ Valores seguidos de letras distintas são diferentes estatisticamente ($P < 0,05$).

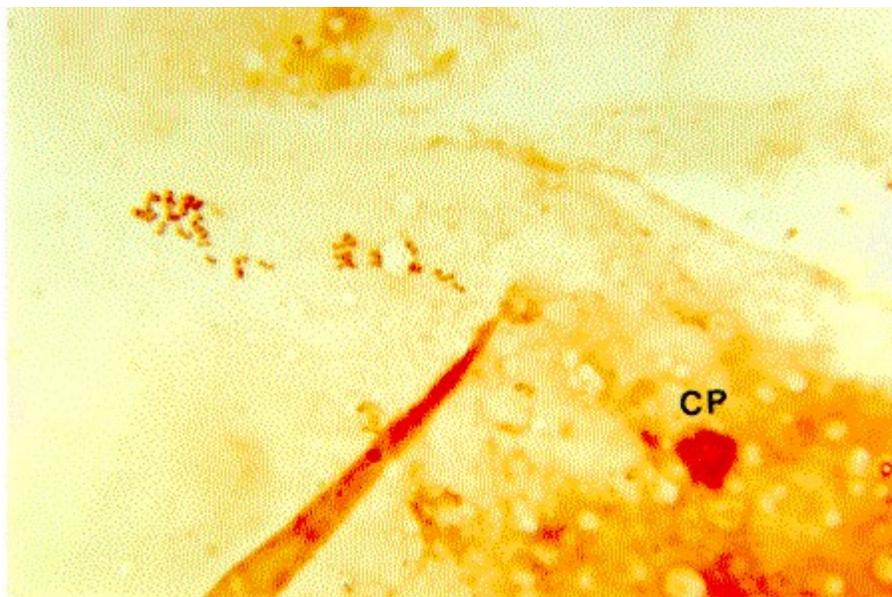


FIG. 1. Configuração cromossômica em metáfase II de ovócito bovino, criopreservado com 1,2 propanediol, após 24 horas de maturação *in vitro*. CP: conjunto de cromossomos pertencentes ao corpúsculo-polar (1000 x).

Tais resultados demonstram que, com o procedimento deste experimento, PROH não foi eficiente em proteger COC imaturos bovinos do processo de congelamento.

Os resultados de maturação *in vitro* do presente experimento foram inferiores aos 8,3% obtidos por Yang et al. (1994), utilizando COC e 1,6 M PROH com um banho para desidratação e reidratação. O uso de ovócitos desnudos pode não interferir na taxa de maturação *in vitro* (Chian et al., 1994), mas pode permitir a entrada e saída de agentes protetores de maneira mais fácil (George et al., 1992), necessitando de um tempo menor para desidratação. No entanto, deve-se considerar que a presença das células do *cumulus* durante a maturação *in vitro* é importante para a fecundação e posterior desenvolvimento inicial *in vitro* do zigoto (Chian et al., 1994). Por isso, os ovócitos deste experimento foram criopreservados com suas células do *cumulus*, submetido a três banhos de desidratação e reidratação, que podem ter sido insuficientes para o trânsito do crioprotetor entre o meio extra e intracelular do COC. Isso mostra que talvez o COC necessite de maior número de banhos para reidratação do que o utilizado por Yang et al. (1994) e no presente experimento. Entretanto, outros experimentos utilizando COC congelados após a maturação *in vitro* e banhados apenas uma ou três vezes, apresentaram melhores resultados de fecundação *in vitro* (Fuku et al., 1992; Otoi et al., 1993). Ovócitos imaturos parecem ser mais sensíveis durante as fases de desidratação e reidratação que ovócitos maturados *in vitro*.

As relações existentes entre ovócitos com células do *cumulus* compactas e sua capacidade de maturar *in vitro*, e entre a expansão das células do *cumulus* e a taxa de maturação *in vitro*, verificada em ovócitos frescos (Madison et al., 1992; Sirard et al., 1992), pode não ocorrer em ovócitos imaturos recém-descongelados e reidratados ou após a maturação deles *in vitro*. Neste experimento, encontraram-se 71,32% e 68,02% de COC com morfologia normal nos tratamentos 1 e 2, respectivamente, e expansão das células do *cumulus* em todos os ovócitos criopreservados após a maturação *in vitro*. Porém, a taxa de maturação nuclear foi baixa (2,04% e 0% para 1,6 M e 2,0 M, respectivamente), indicando que esses ovócitos não estavam aptos a maturar. Resultado semelhante foi observado por Yang et al. (1994), que encontraram 80,9% de COC com morfologia normal e 60% de expansão das células do *cumulus*, mas apenas 8,3% de maturação *in vitro*. Talvez lesões importantes estejam ocorrendo no nível citoplasmático, sem afetar em demasia a morfologia dos ovócitos. Nesse caso a avaliação morfológica após descongelamento e reidratação pode não indicar o número de ovócitos realmente aptos a maturar. O mesmo é válido para a avaliação após a maturação *in vitro*, uma vez que a expansão das células do *cumulus* em COC criopreservados parece não ser um bom indicador da maturação, necessitando-se realizar a avaliação da maturação nuclear.

Verificou-se que a maioria dos COC criopreservados com 1,6 M e 2,0 M de PROH não foram aptos a atingir metáfase I ou metáfase II. No entanto, os ovócitos apresentaram uma condensação dos cromossomos (Fig. 2), independentemente da concentração de PROH utilizada. Para verificar se essa condensação ocorreu antes da congelamento, ovócitos imaturos foram corados pelo mesmo procedimento utilizado nos ovócitos congelados. Os ovócitos permaneceram por 90 minutos em meio Talp HEPES, aquecido a 37°C, tempo necessário para a aspiração e início da congelamento. Esses ovócitos apresentaram uma condensação dos cromossomos menor do que os congelados, confirmando Süß et al. (1988), que verificaram que o processo de condensação pode ser induzido logo após a aspiração dos ovócitos dos folículos, mas que o período de condensação dos cromossomos, na ausência de FSH, vai de 8 a 10 horas após o início da maturação *in vitro*.

Esses estudos demonstram que a condensação dos cromossomos inicia-se logo após a aspiração, mesmo o ovócito estando em estágio de VG, e que os cromossomos continuam se condensando até entrarem em metáfase I, o que ocorre após 10 horas de cultivo (Sirard et al., 1989).



FIG. 2. Condensação cromossômica de ovócitos bovi-nos criopreservados com 1,2 propanediol, após 24 horas de maturação *in vitro* (1000 x).

Desse modo, provavelmente, a condensação dos cromossomos observada após a maturação *in vitro* dos ovócitos congelados não ocorreu antes da congelamento, e sim durante o período de cultivo após a descongelamento e a reidratação. Isso porque a condensação observada nos ovócitos imaturos foi em grau menor do que em ovócitos congelados. Essa condensação aumenta de acordo com o tempo de cultivo, podendo levar até 13 horas (Süß et al., 1988), até que os cromossomos entrem em metáfase I.

Essas observações indicam que os ovócitos congelados iniciaram a maturação, mas não progrediram além da condensação dos cromossomos, não tendo sequer iniciado a metáfase I. Os motivos dessa ausência de desenvolvimento ainda não estão estabelecidos. Alguns autores postulam que a quebra da VG (BDVG) e o início da condensação dos cromossomos são dependentes da síntese protéica (Sirard et al., 1989). Esses autores verificaram que a ciclohexamida, um inibidor da síntese protéica, bloqueia a BDVG quando adicionada nas três primeiras horas da maturação *in vitro*, e inibe a metáfase I, permitindo apenas a condensação dos cromossomos, quando adicionada entre seis e nove horas de maturação. Esses dados indicam a necessidade da síntese protéica para o reinício e continuação da meiose. Algumas organelas, como o retículo endoplasmático associado com ribossomas e o Complexo de Golgi, desempenham um papel

fundamental no acúmulo e processamento de proteínas (Alberts et al., 1994). Lesões nessas organelas durante a criopreservação podem prejudicar a síntese protéica ou diminuir o aproveitamento de proteínas.

Alguns estudos analisaram a ultra-estrutura de ovócitos bovinos imaturos e maturados *in vitro* após a criopreservação, pelo método clássico, com glicerol ou PROH e verificaram que, após a criopreservação, ovócitos de bovinos apresentam lesões no retículo endoplasmático (RE), Complexo de Golgi e mitocôndrias (Yang et al., 1994; Schmidt et al., 1995), indicando a vulnerabilidade dessas organelas citoplasmáticas ao processo de criopreservação.

Utilizando-se ovócitos imaturos, em estágio de VG ou BDVG, essas lesões podem impedir que esses ovócitos atinjam a metáfase, ocorrendo apenas a condensação dos cromossomos. As lesões podem afetar a síntese, glicosilação e secreção de proteínas, agindo de maneira semelhante aos inibidores da síntese protéica.

Outra hipótese para os ovócitos não terem prosseguido a meiose é descrita por Schroeder et al. (1990), segundo os quais ovócitos imaturos podem sofrer danos na organização dos microtúbulos durante a criopreservação, influenciando na 1ª divisão meiótica. Se, para ocorrer a metáfase I, são necessários os microtúbulos para a formação dos fusos, e como esses são estruturas protéicas, as lesões no RE e Complexo de Golgi também podem afetar a formação dos fusos. Além disso, Yang et al. (1994) observaram que os microtúbulos podem ser destruídos na criopreservação, assim tanto a não formação e/ou a destruição dos microtúbulos podem prejudicar a organização dos fusos, evitando que os ovócitos atinjam a metáfase I.

Alterações nas células do *cumulus*, como na sua síntese protéica ou na comunicação com o ovócito, também podem prejudicar o processo de maturação (Schroeder et al., 1990).

CONCLUSÕES

1. O 1,2 propanediol, nos gradientes de concentrações de 1,6 e 2,0 M, não são eficientes para a crioproteção de COC imaturos bovinos, pela técnica utilizada.

2. A relação entre morfologia de ovócitos descongelados e reidratados e sua capacidade de maturar *in vitro* não é proporcional, assim como a expansão das células do *cumulus* também não é um bom indicador da maturação *in vitro*, como ocorre com ovócitos frescos.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. **Molecular biology of the cell**. 3.ed. New York: Garland Pub., 1994. 1294p.
- BAVISTER, B.D.; LEIBFRIED, M.L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the Golden hamster in a defined culture medium. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.28, p.235-243, 1983.
- CARROLL, J.; WARNES, G.M.; MATTHEWS, C.D. Increased in digyny explain polyploid after in vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.85, p.489-494, 1989.
- CHIAN, R.C.; NIWA, K.; SIRARD, M.A. Effects of "cumulus" cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes in vitro. **Theriogenology**, Stoneham, v.41, p.1499-1508, 1994.
- COSTA, E.P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultra-estruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos "in vitro"**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1994. 155p. Tese de Doutorado.
- FUKU, E.; KOJIMA, T.; SHIOYA, Y.; MARCUS, G.J.; DOWNEY, B.R. *In vitro* fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. **Cryobiology**, San Diego, v.29, p.485-492, 1992.
- GEORGE, M.A.; JOHNSON, M.H.; VICENT, L. Use of fetal bovine serum to protect against zona hardening during preparation of mouse oocytes for cryopreservation. **Human Reproduction**, Oxford, v.7, p.408-412, 1992.
- GREVE, T.; MADISON, V. *In vitro* fertilization in cattle: a review. **Reproduction Nutrition and Development**, Paris, v.31, p.147-157, 1991.
- KOLA, I.; KIRBY, C.; SHAW, J.; DAVEY, A.; TROUSON, A. Vitrification of mouse oocytes result in aneuploid zygotes and malformed fetuses. **Teratology**, New York, v.38, p.467-474, 1988.
- LIM, J.M.; FUKUI, Y.; ONO, H. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stage followed by in vitro maturation and fertilization. **Theriogenology**, Stoneham, v.37, p.351-361, 1992.

- MADISON, V.; AVERY, B.; GREVE, T. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.27, p.1-11, 1992.
- NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, Stoneham, v.35, p.109-124, 1991.
- OCAÑA QUERO, J.M.; MORENO MILLAN, M.; VALERA CORDOBA, M.; RODERO FRANGUILLO, A. The influence of different types of mediasupplement on the meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, Stoneham, v.41, p.405-411, 1994.
- OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; KONDO, S.; SUZUKI, T. Developmental capacity of bovine oocytes frozen in different cryoprotectants. **Theriogenology**, Stoneham, v.40, p.801-807, 1993.
- PARKS, J.E.; RUFFING, N.A. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v.37, p.59-73, 1992.
- PICKERING, S.J.; JOHNSON, M.H. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. **Human Reproduction**, Oxford, v.2, p.207-216, 1987.
- PIMENTEL-GOMES, F.P. **Curso de Estatística Experimental**. 7.ed. Piracicaba: Nobel, 1977. 430p.
- SCHELLANDER, K.; PELI, J.; SCHMOLL, F.; BREM, G. Effects of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and unmaturing bovine oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v.42, p.909-915, 1994.
- SCHMIDT, M.; HYTTTEL, P.; AVERY, B.; GREVE, T. Ultrastructure of *in vitro* matured bovine oocytes after controlled freezing in 10% glycerol. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.37, p.281-290, 1995.
- SCHROEDER, A.C.; CHAMPLIN, A.K.; MOBRAATEN, L.E.; EPPIG, J.J. Development capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.89, p.43-50, 1990.
- SHAW, J.M.; TROUSON, A.O. Parthenogenetic activation of unfertilized mouse oocytes by exposure to 1,2 propanediol is influenced by temperature, oocyte age and "cumulus" removal. **Gamete Research**, New York, v.24, p.269-279, 1989.
- SIRARD, M.A.; COENEN, K.; BILODEAU, S. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v.37, p.39-57, 1992.
- SIRARD, M.A.; FLORMAN, H.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; BARNES, F.L.; SIMS, M.L.; FIRST, N.L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.40, p.1257-1263, 1989.
- SÜSS, U.; WUTHRICH, K.; STRANZINGER, G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.38, p.871-880, 1988.
- VAN BLERKOM, J. Maturation at high frequency of germinal-vesicle-stage mouse oocytes after cryopreservation : alterations in cytoplasmic, nuclear, nucleolar and chromosomal structure and organization associated with vitrification. **Human Reproduction**, Oxford, v.4, p.883-898, 1989.
- YANG, Q.Z.; SUN, Q.Y.; LIU, G.Y.; QIN, P.C.; FENG, H.L. Developmental competence and ultrastructure damage of cryopreserved G.V. stage bovine oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v.41, p.342, 1994.